

Epithelmodelle als Ersatz für Tierversuche in der Arzneimittelzulassung*

CHRISTEL C. MÜLLER-GOYMANN

Am Rübenberg 16, D-38104 Braunschweig

Tierversuche gelten in der Forschung und Entwicklung neuer Medikamente für Mensch und Tier als unverzichtbar. Jährlich veröffentlicht das Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) die Anzahl von Wirbeltieren, die in Tierversuchen im Berichtszeitraum verwendet wurden (1). Die Gesamtzahl an Tieren, die in Tierversuchen und für andere wissenschaftliche Zwecke verwendet wurden, ist seit 2004 von ca. 2,3 Millionen auf ca. 2,9 Millionen bis 2011 gestiegen. Als Hauptverursacher für einen steigenden Bedarf an Wirbeltieren ist beispielsweise die biologische Grundlagenforschung zu nennen. Berücksichtigt man ausschließlich die Entwicklung neuer Medikamente für Mensch und Tier, stagniert die Zahl der Tierversuche bzw. ist seit 2009 sogar rückläufig, weil Alternativmethoden für Tierversuche zunehmend etabliert werden. Die Arzneimittelzulassung (Regulatory Acceptance) spielt dabei neben Entwicklung, Validierung und Wissenschaftlicher Akzeptanz eine wichtige Rolle.

Seit 2000 stellt die Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET) eine umfangreiche Online-Datenbank zur Verfügung, die bewertete Alternativmethoden zu Tierversuchen enthält (2). Diese Alternativmethoden berücksichtigen mindestens eines der drei international anerkannten, von Russel und Burch (1959) als „3R“ definierten Kriterien – Replacement (Ersatz), Reduction (Reduzierung der Zahl) und Refinement (Reduzierung von Schmerzen und Leid von Versuchstieren) von Tierversuchen.

Alternativmethoden für Tierversuche in der Prüfung von Arzneimitteln

Damit der Wirkstoff eines Arzneimittels für den Patienten biologisch verfügbar wird, muss er nach Freigabe aus der Formulierung Biomembranen passieren. Die Art der Applikation – beispielsweise einer Lösung als Injektion direkt ins Blut oder nach Schlucken über den Gastrointestinaltrakt zeitlich verzögert ins

* Kurzfassung des am 08.03.2013 in der Plenarversammlung der Braunschweigischen Wissenschaftlichen Gesellschaft gehaltenen Vortrags als einer von drei Beiträgen zum Thema „Modelle in verschiedenen Disziplinen“.

Blut – beinhaltet die Überwindung unterschiedlicher Barrieren. Das Gleiche gilt außerdem für das finale Erreichen des Wirkortes. So sind die Blutgefäße im Gehirn derartig dicht mit Endothelzellen ausgekleidet, dass die sogenannte Blut-Hirn-Schranke nur bestimmte Moleküle passieren lässt. In Leber, Milz und rotem Knochenmark sind hingegen sowohl die Endothelschicht als auch die Basallamina der Blutgefäße lückenhaft, damit ein schneller Stoffaustausch für alle Arten von Stoffen möglich ist. Zwischen diesen Extremen sind die Blutgefäße aller anderen Organbereiche einzuordnen. Es liegt daher nahe, den Transport über Epithelien bzw. Endothelien hinweg nachstellen zu wollen. Die prinzipielle Nachbildung einer biologischen Membran aus Phospholipiden mit ihrem Doppelschichtcharakter gelingt zwar auch in einfachen physikalischen Membranmodellen, doch können diese der unter In-vivo-Bedingungen vorliegenden Komplexität und Variabilität nicht gerecht werden.

Unter Verzicht auf isolierte Gewebestücke von Tieren oder Menschen gelingt die Nachstellung von Transportprozessen mit Epithelmodellen aus der Zellkultur. Zweidimensionale Modelle, d.h. die flächenhafte Ausprägung einer einzelnen zusammenhängenden Schicht aus zahlreichen gleichartigen Zellen, erlauben die Untersuchung des Wirkstofftransports gelöster Moleküle aus einer einfachen Lösung oder gegebenenfalls im Einzelfall aus einem flüssigen Arzneimittel (z.B. Emulsion, Nanosuspension). Die Untersuchung des Wirkstofftransports aus dem applizierten Arzneimittel mit nicht flüssigem sondern halbfestem oder festem Charakter (Creme, Tablette) in ein physiologisches Akzeptorkompartiment verlangt dreidimensionale Gewebemodelle. Für nahezu alle Gewebe mit Absorptionsfunktion ist es inzwischen gelungen, solche 3D-Modelle in der Zellkultur zu züchten.

Am Beispiel von Modellen der Augencornea für die Untersuchung von Augenarzneimitteln und von Hautmodellen für die Arzneistoffaufnahme über die Haut sollen im Folgenden die Entwicklung solcher Modelle sowie deren Möglichkeiten und Grenzen bei ihrem Einsatz für Absorptionsuntersuchungen aus Arzneimitteln aufgezeigt werden.

Modell der humanen Cornea des Auges

Der transparente vordere Teil des menschlichen Auges ist die Cornea (Augenhornhaut). Sie erlaubt den für den Sehprozess essentiellen Lichtdurchtritt und grenzt das Augeninnere von der Umwelt ab. Die Cornea ist mehrschichtig aufgebaut: eine mehrreihige Epithelschicht sitzt einer kollagenreichen Hydrogelmatrix mit inkorporierten Keratozyten auf. An dieses kollagenreiche Stroma schließt sich eine einlagige Endothelschicht an, die in direktem Kontakt mit dem „Kammerwasser“ der vorderen Augenkammer im Innern des Auges steht. Damit der Wirkstoff eines in die Tränenflüssigkeit eingebrachten Augenarzneimittels in das Augeninnere gelangt, müssen alle Schichten der Cornea überwunden werden.

Humane Corneaspenden stehen für Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen de facto nicht zur Verfügung, weil die Zahl an verfügbaren Hornhautspenden nicht einmal den Bedarf nach Corneae für die Transplantation deckt. Bei der Präparation von Spenderhornhäuten für die Transplantation bleiben jedoch ringförmige Gewebereste der an die Cornea angrenzenden Lederhaut (Sklera) übrig. Aus diesen skleralen Ringen ist es mit Hilfe von Zellkulturtechniken gelungen, die Stammzellen zur Vermehrung (Proliferation) und Differenzierung zu den die Cornea aufbauenden Zelltypen anzuregen und in ausreichend hoher Zahl anzuzüchten. Durch schrittweise Kultivierung der verschiedenen Schichten aus den jeweiligen Zelltypen wird dann innerhalb von ca. 4 Wochen ein Konstrukt aufgebaut, das in Morphologie und Transportverhalten für Wirkstoffmoleküle eine große Ähnlichkeit mit der humanen Cornea aufweist (3–5).

Da Species-spezifische Besonderheiten bezüglich der Funktionalität der Organe bekannt sind, ist es nicht überraschend, dass der Wirkstofftransport durch die Cornea des Schweins und des Kaninchens – beide Versuchstiere wurden bislang am häufigsten für derartige Tierversuche verwendet – deutlich voneinander verschieden ist. Die Kaninchencornea ist ca. 2- bis 4-mal permeabler als die Schweinecornea. Ein von Reichl durch Reduktion auf die beiden äußeren Schichten weiterentwickeltes „Hemicornea-Konstrukt“ liegt zwischen den Permeabilitätsergebnissen der tierischen Gewebe (6). Das Hemicorneakonstrukt beinhaltet als weitere Modifizierung immortalisierte (= unsterblich gemachte) Zelllinien. Dies hat den Vorteil einer unbegrenzten Verfügbarkeit dieser Zellen und einer reproduzierbaren Kultivierung der Konstrukte in gleichbleibender Qualität.

Für eine behördliche Akzeptanz und einen verbreiteten Einsatz des Modells ist eine Validierungsstudie nötig. Vor der Validierung wird in der Regel eine Prävalidierung durchgeführt. In einer solchen Prävalidierung wird in der Regel die Methodik verfeinert und danach die Kultivierungsvorschrift (standard operation procedure SOP) in wenigstens zwei weitere Labore übertragen und anhand einiger weniger ausgesuchter Substanzen überprüft (7). Diese Prävalidierungsstudie konnte die reproduzierbare Kultivierung des humanen Corneamodells mit gleichbleibender hoher Qualität in Bezug auf seine Barriereigenschaften für den transcornealen Substanztransport bestätigen. Solche organotypischen Corneamodelle können daher helfen Tierversuche zu reduzieren und zum Teil sogar zu ersetzen. Gleichzeitig werden die mit Züchtung und Haltung verbundenen hohen Kosten von Tierversuchen reduziert.

Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut als größtes Organ des Menschen hat vielfältige Funktionen zu erfüllen. Sie schützt vor dem Austrocknen und reguliert gleichzeitig die Körpertemperatur, sie schützt vor mechanischer Verletzung sowie dem Eintritt toxischer Substanzen

und Mikroorganismen aus der Umgebung in das Körperinnere. Der Schutz vor einer Vergiftung durch Schadstoffe aus der Umwelt ist durch die äußere Gewebeschicht der Haut, die aus abgestorbenen Zellen bestehende Hornhaut (Stratum corneum), gegeben. Das Stratum corneum stellt eine exzellente Barriere gegen einerseits das Verdunsten von Wasser und andererseits gegen den Transport von in Wasser löslichen Molekülen dar.

Das Stratum corneum nimmt seinen Ursprung in teilungsfähigen Zellen (Keratinocyten) der untersten Ebene der nicht durchbluteten Epidermis (Oberhaut). Mit der ersten Teilung verlieren diese Keratinocyten die Proliferationsfähigkeit und reifen auf ihrem ca. 30 Tage in Anspruch nehmenden Weg an die Hautoberfläche (Differenzierung). Sie verändern dabei ihre Morphologie und Funktion und sterben schließlich ab. Die toten Korneozyten bilden das Stratum corneum und werden schließlich als submikroskopisch kleine Einzelzellen oder Zellverbände abgeschilfert.

Unter der Epidermis befindet sich die von Blutgefäßen und Nerven durchzogene Lederhaut (Dermis oder Corium genannt). In ihr sind weitere Hautanhangsorgane wie Haare, Nägel, Schweiß- und Talgdrüsen verankert und ragen bis an die Hautoberfläche. Die Dermis ist eine hoch elastische, kollagen- und elastinreiche Schicht, in die die Zellen der Dermis (Fibroblasten) eingebettet sind.

Nach innen schließt sich das subkutane Fettgewebe (Subkutis) mit Schutzfunktion gegen Stoß und mechanische Verletzungen an. Es dient außerdem der Speicherung von Energiereserven.

Humane Hautmodelle für die Prüfung von Arzneimitteln

Organotypische 3D Humanhautmodelle beinhalten die lebende Epidermis und die Dermis. Sie werden in ähnlicher Weise wie die Corneamodelle über ca. 4 Wochen kultiviert. Die Ausbildung einer voll entwickelten Barrierefunktion fehlt dabei allerdings, da in dieser relativ kurzen Zeit kein vielschichtiges zusammenhängendes Stratum corneum entsteht. Bezüglich ihrer Barriereigenschaften für einen Substanztransport ähneln die 3D Hautmodelle der Säuglingshaut und nicht der Haut eines Erwachsenen, da es ca. 1 Jahr dauert, bis sich beim Neugeborenen die bis zum Lebensende unverändert funktionierende Schutzbarriere der Hornhaut aufgebaut hat.

Auf der Haut anzuwendende Arzneimittel können vielfältige Ziele verfolgen:

1. Es kann ausschließlich das Stratum corneum adressiert werden – beispielsweise mit einem Desinfektionsmittel die Hautoberfläche bei intakter Haut oder mit einem „Hühneraugenpflaster“ die Hornhaut selbst. Mit Hilfe des Pflasters soll übermäßige Hornhaut erweicht und abtragbar werden.

2. Es kann eine Erkrankung in den lebenden Bereichen der Haut (Epidermis, Dermis, Subkutis) behandlungsbedürftig sein oder es sollen Schmerzen im direkt unter der Haut liegenden Muskelgewebe bzw. im Gelenk therapiert werden.

3. Wird ein opiooidhaltiges Schmerzpfaster auf der Haut appliziert, muss der Arzneistoff nach Freigabe aus dem Pflaster und der Permeation durch Hornhaut und Epidermis bis in die Dermis gelangen, dort in die Gefäße aufgenommen werden, um mit dem Blutstrom schließlich seinen Zielbereich, das Schmerzzentrum im Gehirn, zu erreichen. Bei solchen auf der Haut applizierten Transdermalpflastern sind Applikations- und Wirkort nicht in unmittelbarer Nähe.

Je nach Fragestellung werden unterschiedliche Modelle einzusetzen sein. Ist die Überwindung der Hornhautbarriere der entscheidende Schritt für den Stofftransport aus einem Arzneimittel, ist isoliertes Stratum corneum aus Humanhautspenden aus der plastischen Chirurgie das geeignete Modell. Für die Untersuchung der Permeation in tiefer gelegene Gewebe der Haut sind die lebenden Schichten unverzichtbar und das 3D Humanhautmodell kommt zum Einsatz. Es ist nicht nur für Arzneistoffabsorptionsuntersuchungen geeignet sondern liefert auch wertvolle Ergebnisse zu Fragen des Schädigungspotentials von Arzneimitteln. In diesen Untersuchungen wird die Toxizität indirekt über die Erfassung der Viabilität (Lebensfähigkeit) der Modelle im Anschluss an eine Behandlung quantifiziert. Nach dem gleichen Prinzip sind die Effekte von Formulierungen auf die Wundheilung in einem Wundheilungsmodell zu ermitteln (8).

Sind Arzneimittel zur Behandlung von Erkrankungen der Hautanhangsorgane (z.B. Nagelpilz oder Entzündung der Talgdrüsen bei Akne) zu prüfen, werden weitere geeignete Modelle benötigt. Therapeutika gegen Nagelpilzerkrankungen lassen sich mit einem vollständig zellfreien Modell testen. Dazu können Keratinplättchen, die in einem mehrstufigen Verfahren aus naturblondem oder grauem Menschenhaar hergestellt werden (9), mit typischen, beim Menschen Nagelpilz verursachenden Mikroorganismen infiziert werden. Deren Abtötung durch die zu prüfenden Arzneimittel wird anschließend untersucht (10). Anstelle solcher Keratinplättchen werden alternativ präparierte Scheiben aus Rinderhufen verwendet, die allerdings abweichende Eigenschaften im Vergleich mit humanem Nagelmaterial aufweisen. Zur Untersuchung der Erreichbarkeit der Talgdrüse durch auf der Haut applizierte Arzneimittel bietet sich das sogenannte Schweineohrmodell an. Schweineohren von Schlachttieren für die Lebensmittelerzeugung werden in In-vitro-Untersuchungen verwendet, bei denen nach definierter Einwirkung des Arzneimittels eine Biopsie des Haarschaftes mit anhängender Talgdrüse durchgeführt wird. In dieser Biopsie lässt sich der Gehalt an Arzneistoff analytisch mit für den jeweiligen Arzneistoff spezifischen Nachweistechiken bestimmen (11).

Zusammenfassung und Ausblick

Gewebemodelle aus der Zellkultivierung humaner Epithelien und Endothelien bieten die Möglichkeit einer Reduzierung von Tierversuchen. Nahezu alle Organbereiche lassen sich bereits für die Prüfung des transepithelialen Transports von Arzneistoffen aus Arzneimitteln nachstellen. Die Bandbreite reicht von den im Vortrag vorgestellten Haut- und Augencorneamodellen über die Schleimhaut von Nase, Lunge oder des Magen-Darm-Trakts bis hin zur Nachbildung der Blut-Hirn-Schranke. Die kontinuierliche Weiterentwicklung bestehender Modelle wird zukünftig eine den physiologischen Gegebenheiten immer besser angepasste Qualität ergeben, so dass Reduzierung und weitest gehender Ersatz von Tierversuchen fortschreiten werden.

Literatur

- (1) http://www.bmelv.de/DE/Landwirtschaft/Tier/Tierschutz/_texte/Versuchstierzahlen2012.html
- (2) http://www.bfr.bund.de/de/animalt_zebet_datenbank_fuer_alternativmethoden_zu_tierversuchen-59741.html
- (3) REICHL, MÜLLER-GOYMANN (2004) Pharm Ztg **149**: 38–44
- (4) REICHL, BEDNARZ, MÜLLER-GOYMANN (2004) Br J Ophthalmol **88**: 560–565
- (5) REICHL, DÖHRING, BEDNARZ, MÜLLER-GOYMANN (2005) Eur J Pharm Biopharm **60**: 305–308
- (6) REICHL, (2008) J Pharm Pharmacol **60**: 299–307
- (7) HAHNE et al. (2012) J Pharm Sci **101**: 2976–2988
- (8) KOLDITZ, KRAUSZE, HEINZ, NIEMANN, MÜLLER-GOYMANN (2013) Eur J Pharm Biopharm doi: 10.1016/j.ejpb.2013.10.003.
- (9) LUSIANA, REICHL, MÜLLER-GOYMANN (2011) Eur J Pharm Biopharm **78**: 432–440
- (10) LUSIANA, REICHL, MÜLLER-GOYMANN (2013) Eur J Pharm Biopharm **84**: 599–605
- (11) LAUTERBACH, MÜLLER-GOYMANN (2014) Int J Pharm submitted